

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

**POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE PROTEINA
KLOROPLASTA**

**POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF
CHLOROPLAST PROTEINS**

Janja Kopic

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE.....	3
2.1. Fosforilacija.....	4
2.2. Acetilacija.....	6
2.2.1. N ^α –acetilacija.....	7
2.2.2. Acetilacija lizina.....	7
2.3. Metilacija lizina i arginina.....	8
2.4. Nitracija tirozina i S-nitrozilacija.....	9
2.5. Glikozilacija.....	10
2.6. Sumoilacija.....	11
3. ZAKLJUČAK.....	13
4. LITERATURA.....	14
5. SAŽETAK.....	16
6.SUMMARY.....	16

1. UVOD

Sinteza proteina jedan je od ključnih procesa odgovornih za funkcioniranje i pravilno odvijanje biokemijskih reakcija na kojima počiva život, rast i razvoj svih živih organizama temelj na kojemu će se graditi kompleksnost samog organizma. Procesi koji su važni za biosintezu proteina su transkripcija i translacija, a određivanje njihove uloge i funkcije postiže se dodatnim postupcima modificiranja nastalih proteina tijekom i nakon same biosinteze.

Kako se neprestano mijenjaju okolišni čimbenici, tako dolazi do izražavanja različitih utjecaja na organizam koji se mora prilagoditi ovisno o uvjetima u kojima se nalazi. To se postiže kontroliranjem ekspresije gena koji kodiraju za pojedine proteine, koji će omogućiti organizmu prilagođavanje okolišnim uvjetima.

U ovom radu će se razmatrati posttranslacijske modifikacije (PTM) iz perspektive fotosintetskog organela kloroplasta i njegovih proteina reakcijskog središta fotosustava II (*photosystem II*, PSII). Proteinski kompleks PSII lociran je na tilakoidnim membranama kloroplasta, a čine ga heterodimeri homolognih proteina D1 i D2. Taj dimer D1/D2 sadrži različite nosače i ligande koji su nužni za prijenos elektrona kroz reakcijski centar PSII. Protein D1 u svom životnom ciklusu prolazi kroz najmanje pet posttranslacijskih modifikacija a to su: C-terminalno procesuiranje, uklanjanje inicijacijskog ostatka metionina, N-acetilacija nastalog N-terminalnog ostatka treonina, kovalentna palmitolacija i O-fosforilacija na N-terminalnom kraju treonina funkcionalnog proteina. (Battey i sur., 1993)

Provedena su mnoga istraživanja vezana za djelovanje PTM na djelotvornost i funkciju metaboličkih procesa koji se odvijaju unutar kloroplasta kao i na same gradivne komponente tog plastida, ali to je područje još uvijek nedovoljno istraženo i još se traga za nekim odgovorima koji bi pomogli u utvrđivanju pojedinih evolucijskih odnosa i podrijetla PTM kao i određivanju njihovog stvarnog regulatornog potencijala te dali veliki doprinos u razumijevanju biokemijskih reakcija vezanih za fotosintezu koja je jedan od najvažnijih procesa na kojima se zasniva živi svijet. (Lehtimäki i sur., 2015)

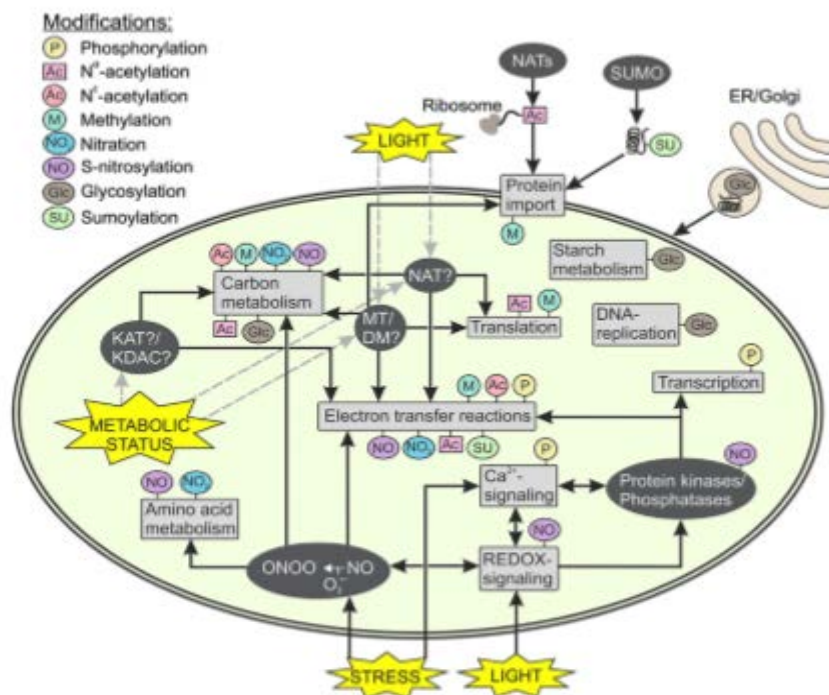
2. POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE

Posttranslacijske modifikacije proteina odnose se na kovalentne modifikacije sintetiziranih proteina, a mogu biti posredovane enzimatskom i ne-enzimatskom aktivnošću. Transkripcijom se određuje primarna struktura proteina, a za uspostavljanje tercijarne i kvarterne strukture neophodne su PTM. Uklanjanjem ili dodavanjem određenih kemijskih skupina na proteine, proteolitičkim cijepanjem njihovih regulacijskih podjedinica ili degradacijom cijelog proteina određuje se njihova tkivno-specifična uloga, ali se ujedno i povećava funkcionalna kompleksnost od genoma pa sve do razine proteoma pojedinih organizama. Poznato je i istraženo nekoliko vrsta PTM: metilacija, acetilacija, fosforilacija, glikozilacija, ubikvitinizacija, nitrozilacija, sumoilacija i dr. (Slika 1.) Količina proteina s istom vrstom modifikacije u stanici je promjenjiva.

PTM se odvijaju na bočnim lancima aminokiselina ili na N- i C- terminalnim krajevima proteina. Kemijskim modificiranjem igraju ključnu ulogu u funkcioniranju proteoma, budući da reguliraju aktivnost, lokalizaciju proteina i interakcije s drugim staničnim molekulama kao što su proteini, nukleinske kiseline, lipidi i neki drugi kofaktori. Uvođenjem novih funkcionalnih skupina proširuje se uveliko paleta od standardnih 20 aminokiselina od kojih su građeni proteini svih organizama. Jedan od oblika posttranslacijske modifikacije može biti i cijepanje peptidne veze, primjerice u obradi propeptida u funkcionalni peptidni oblik ili pak kod postupka uklanjanja inicijacijskog metioninskog ostatka. Formiranje disulfidne veze na cisteinskim ostacima je također jedna od posttranslacijskih modifikacija. Povezivanjem ugljikohidrata na proteine procesom glikozilacije pospješuje se sklapanje proteina, poboljšava stabilnost ali i određuje regulatorna funkcija. Neke vrste posttranslacijskih modifikacija se mogu javiti i kao posljedice oksidacijskog stresa.

Fosforilacija je vrlo čest mehanizam za regulaciju aktivnosti enzima te kao jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija ima regulatornu ulogu tijekom fotosinteze. To je ujedno i najistraživanija PTM u biljaka, dok je primjerice za N^α-acetilaciju poznato da se javlja i na proteinima kloroplasta koji su kodirani u jezgri ali i onima kodiranim u samom plastidu, ali još nije utvrđena njezina fiziološka uloga.

Za aktivnost metaboličkih enzima u kloroplastu ključnu ulogu ima acetilacija lizina zajedno s metilacijom lizina. Također je u biljaka značajna i uloga popravka fotosustava I (PSI), koja se može ostvariti posredovanjem nitracije aminokiseline tirozina. Enzimaska aktivnost ugljične-anhidraze iz kloroplasta uvjetovana je procesom N-glikolizacije. (Battey i sur., 1993)



Slika 1. Prikaz pojedinih posttranslacijskih modifikacija koje se odvijaju na proteinima kloroplasta (Lehtimäki i sur., 2015)

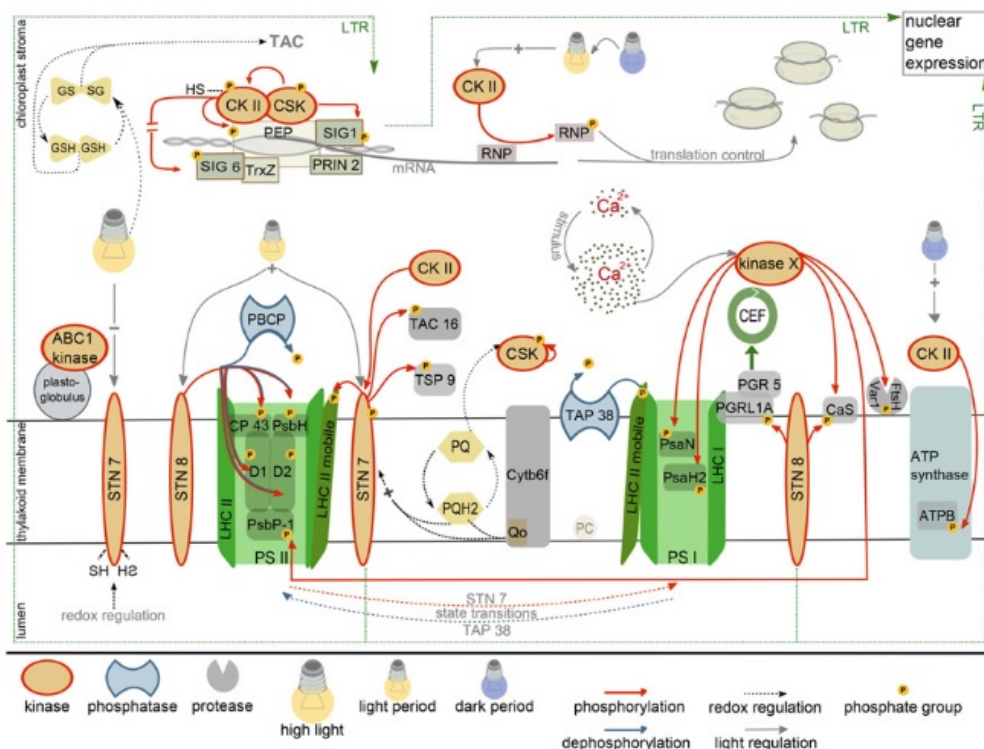
2.1. Fosforilacija

Fosforilacija je proces u kojemu se fosfatna skupina ($-\text{PO}_4^{3-}$) dodaje na neku molekulu i određuje hoće li ta molekula po svojoj funkciji biti aktivna ili ne. Katalizirana je enzimatskom djelotvornošću fosforilaze koja dodaje fosfatne skupine na kemijske spojeve i kinaze koja prenosi fosfatne skupine s jedne molekule na drugu. To je reverzibilan proces, a sukladno s tim djeluju i enzimi fosfataze koji uklanjaju fosfatnu skupinu s molekule. Zbog reverzibilnosti reakcije dolazi do konformacijske promjene te zato mnoge molekule postaju

funkcionalne ili se utišavaju ovisno o dodavanju ili uklanjanju fosfata. Najčešće se odvija na bočnim ograncima aminokiselina serina, treonina, tirozina, i histidina. Dodavanje fosfatne skupine na polarni bočni ogranak aminokiseline može imati takav učinak da pretvori hidrofobni dio proteina u dosta polarni i hidrofilni oblik. To je najčešća PTM proteina u tilakoidnim membranama kloroplasta. Izloženost biljke svjetlosti i drugi ekološki čimbenici utječu na diferencijalnu fosforilaciju proteina uključenih u PSI i PSII, na transport elektrona i raspodjelu energije mijenjajući stopu akumulacije u reakcijskom središtu. (Slika 2.)

Kloroplastni fosfoproteini imaju različite funkcije u metabolizmu makromolekula a tako i u sintezu samog tetrapirola koji je građevna jedinica kloroplastnih pigmenata klorofila, koji su odgovorni za transport elektrona i sintezu energije u obliku ATP-a u procesu fotosinteze. Fosforilacija proteina PSII omogućuje postizanje maksimalne donje granice razine svjetlosti potrebne za učinkovitu fotosintezu. Proteini D1 i D2 iz kompleksa PSII se fosforiliraju na njihovom N-terminalnom kraju u uvjetima jake svjetlosti, a tako i u prisutnosti čimbenika koji izazivaju stres u biljaka. Sukladno s tim moglo bi se reći da fosforilirani proteini unutar kompleksa PSII razvijaju određeni oblik 'pamćenja' na pretrpljene stresne uvjete. Izlaganjem biljke visokoj temperaturi potiče se ubrzana defosforilacija proteina D1 i D2, što inducira sintezu fosfataze, zbog toplinskog šoka, koja ima ulogu uklanjanja fosfatnih skupina sa fosforiliranih proteina te omogućuje popravak oštećenih dijelova PSII. (Pesaresi i sur., 2011) Jednako tako i u listovima izloženim jakoj svjetlosti dolazi do fosforilacije proteina PSI ali i citokroma b_6f i ATP sintaze, koji su važne komponente primarnih odnosno fotokemijskih reakcija fotosinteze. (Rochaix i sur., 2012) U uvjetima koji izazivaju ili induciraju ekscitaciju PSII, reakcije redukcija sastavnih jedinica tog fotosustava, primjerice redukcija elektronskih prenositelja feredoksina i tioredoksina, ali i kontrola plastokinona, također potiču fosforilaciju proteina kloroplasta. (Allen, 2002.)

Većina istraživanja koja se tiču ovog tipa PTM proteina kloroplasta izvedena su u uvjetima *in vitro* na izoliranim tilakoidnim membranama i kloroplastima pod osmotskim stresom, pa se postavlja pitanje kolika je uopće stopa podudaranja fosforilacija plastidnih proteina *in vitro* sa onima iz tilakoida u uvjetima *in vivo*. Ono što je poznato je da je fosforilacija proteina D1 u uvjetima *in vitro* i *in vivo* identična. (Battey i sur., 1993)



Slika 2. Prikaz reakcijskih središta PSII i PSI i komponenata primarnih reakcija fotosinteze te djelovanje enzima kinaze i fosfataze na fosforilaciju i defosforilaciju proteina odgovornih za prijenos elektrona u uvjetima različitog intenziteta osvjetljenja (www.frontiersin.org)

2.2 Acetilacija

Acetilacija je proces kovalentnog uvođenja acetilne funkcionalne skupine na različite kemijske spojeve, a provodi se uz supstituciju sa vodikovim atomom koji izlazi iz spoja. Supstrat za acetilaciju je acetil-CoA sa kojega se acetilna skupina prenosi uz pomoć enzima acetiltransferaze na N-terminalni kraj proteina ili na ϵ -amino grupu bočnog ostatka aminokiseline lizina. Jedna je od najučestalijih PTM, ali je dostupna mala količina informacija o toj modifikaciji. N-terminalna acetilacija je ireverzibilan proces, dok je acetilacija lizina reverzibilan proces u koji su uključene i lizin deacetiltransferaze, koje uklanjaju acetilnu skupinu sa ϵ -amino grupe lizina. (Nallamilli i sur., 2014)

2.2.1. N^α-acetilacija

Uz to što je ireverzibilan proces, za N^α-acetilaciju je karakteristično i to da uzrokuje promjenu izoelektrične točke (pI) acetiliranog proteina te ju pomiče prema kiseloj vrijednosti na način da neutralizira pozitivan naboj na N-terminalnom kraju. Odvija se u citoplazmi stanice, a kataliziraju je enzimi iz skupine acetiltransferaza. (Lehtimäki i sur., 2015)

Smatra se da acetilacija N-terminalnog kraja ima zaštitnu ulogu te sprječava degradaciju proteina, što znači da su acetilirani proteini znatno stabilniji i otporniji *in vivo* od neacetiliranih proteina. Na primjer, dokazano je da je u sušnim uvjetima acetilirani oblik ATP-sintaze stabilniji i otporniji na degradaciju od neacetiliranog oblika tog proteina. (Lehtimäki i sur., 2015). Istraživanja su pokazala da ova PTM ima mnogostruke učinke u regulaciji biokemijskih reakcija i katalitičkoj aktivnosti pojedinih enzima koji su u biljnom organizmu važni u razdoblju cvjetanja te razvijanja listova, cvjetova i plodova, ali su također važni i u embrionalnom razvoju biljke. (Ferrández-Ayela i sur. 2013)

U kloroplastnim proteinima razlikuju se tri tipa N^α-acetilacije. Prva se odnosi na acetilaciju koja se događa u citoplazmi stanice, a odvija se na tranzitnim peptidima koji su kodirani u jezgri; potrebna je acetilacija preproteina kako bi se omogućilo njihovo unošenje u plastid. Drugi tip se odnosi na proteine kodirane genomom jezgre, a koji se acetiliraju unutar samoga kloroplasta nakon transporta peptida u plastid. Treći tip acetilacije događa se na proteinima koji su kodirani kloroplastnim genomom, kao što su to primjerice proteini D1 i D2, proteini velike podjedinice enzima ribuloza-1,5-difosfata (RuBisCO) te ostale komponente reakcijskog središta PSII.

2.2.2. Acetilacija lizina

Proteini su obično acetilirani na bočnim ograncima aminokiseline lizina, a za tu reakciju ključna molekula je acetyl-CoA koji služi kao donor acetilne skupine. Prve acetilacije lizina zabilježene su na histonima, a tek nedavno je uočen prvi citoplazmatski protein acetiliran na lizin, α -tubulin. Ovaj tip PTM važan je za održavanje i kontrolu mnogih aspekata primarnog metabolizma, ekspresije gena, signalizacije između stanica te tako i samog rasta i razvoja. (Rao i sur., 2014)

Radi se o reverzibilnom procesu, a odgovorni enzimi su acetiltransferaze i deacetilaze. Uklanjanje pozitivnog naboja na N-terminalnom kraju proteina direktno utječe na promjenu elektrostatskog stanja modificiranog proteina. Primjerice, u biljci *Arabidopsis thaliana* acetilacija lizina je esencijalna za rast i razvoj biljke, dok je s druge strane biljka koja je imala smanjenu stopu acetilacije lizina, zbog mutacija u genima za sintezu acetiltransferaza i deacetilaza, pokazala poremećaje u rastu. (Wu i sur., 2011) Istraživanja su pokazala da djelomična deacetilacija velike podjedinice enzima RuBisCO u uvjetima *in vitro* povećava maksimum aktivnosti tog enzima te da su mala podjedinica RuBisCO i RuBisCO aktivaza također zahvaćene tom PTM. Iz toga proizlazi da je acetilacija lizina jednim dijelom odgovorna za učinkovitost asimilacije ugljika kroz mnoge mehanizme. (Lehtimäki i sur., 2015)

2.3. Metilacija lizina i arginina

Dodavanje metilnih ($-CH_3$) skupina još jedan je od čimbenika koji utječu na određivanje funkcionalnosti proteina ali i širenje njihovog područja djelovanja. Enzimi koji izvode ovu reakciju su metiltransferaze, a prijenos metilnih skupina obavljaju uz pomoć posrednika S-adenozilmetionina. Metilacija proteina odvija se na dušičnim bočnim ograncima lizina i arginina. Zabilježena je reverzibilnost metilacije lizina uz pomoć demetilaza, ali metilacija dušikovih atoma na N-terminalnom kraju arginina nije reverzibilna što znači da se tom prilikom stvaraju novi ogranci aminokiseline. Tijekom metilacije lizina katalizira se prijenos jedne od tri metilne skupine sa S-adenozilmetionina na ϵ -amino ostatak bočnog ogranka lizina. Za razliku od toga, metiltransferaza koja djeluje na arginin prenosi jednu od dvije metilne skupine na distalni dušikov atom iz gvanidinske skupine bočnog ogranka arginina.

Metilirani proteini kloroplasta su distribuirani u stromi, na tilakoidnim membranama i na ovojnici samog plastida. Utječu na esencijalne metaboličke procese koji uključuju fotosintezu i biogenezu kloroplasta. Primjeri metilacije lizina u biljkama su metilacija velike podjedinice kloroplastnog enzima RuBisCO i enzima fruktoza 1,6-bifosfat aldolaze. U biljci *A. thaliana* metilirani su i neki od proteina akvaporina. Istraživanja su pokazala da metilacija igra ključnu ulogu u regulaciji protein-protein interakcija, reakcijama proteina i nukleinskih kiselina i stabilizaciji proteina. Neki od proteina kloroplasta su jače metilirani u biljaka na svjetlosti nego u onih koje su u tami. Utjecaj ove PTM očituje se jednim dijelom i u staničnoj

signalizaciji, ali i u regulaciji asimilacije CO₂ u biljaka, javljajući se na proteinima uključenim u fiksaciju i asimilaciju CO₂. (Alban i sur., 2014.) Povećanjem broja metilnih skupina povećava se bazičnost i hidrofobnost bočnih ogranaka lizina i arginina bez da se mijenja njihov ukupni naboj, ali djeluje na promjenu stabilnosti i aktivnosti polipeptida.

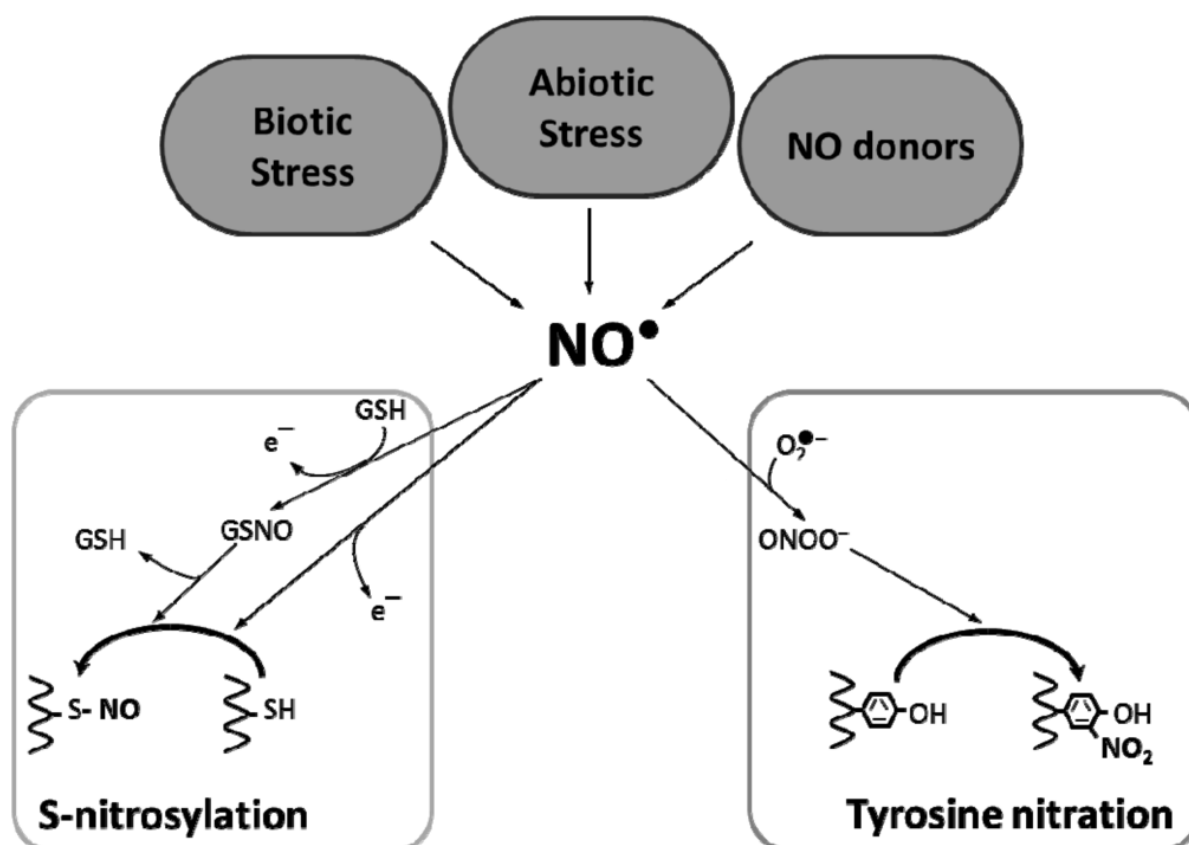
2.4. Nitracija tirozina i S-nitrozilacija

Nitracija je proces u kojemu se nitro skupina (-NO₂) dodaje na neki organski kemijski spoj. Može biti enzimatska ili neenzimatska reakcija, a počinje tako da se dušikov oksid (NO) dodaje na bočne ogranke tirozina, triptofana, cisteina ili metionina ciljanog proteina. Nitracijom se modificiraju i proteini, a ciljne skupine su bočni ogranci aminokiselina tirozina, triptofana, cisteina ili metionina. NO je jedan od ključnih regulatora fizioloških procesa u biljaka. Nekoliko komponenata signalnih putova je povezano sa učinkom NO na biljke, a neki od njih su utjecaj na sekundarne glasnike, protein kinaze ili pak djelotvornost biljnih hormona. Dokazan je i učinak ove PTM na imunološke odgovore biljnog organizma. (Astier i Lindermayr, 2012.)

Pri nitraciji tirozina nitro skupina se kovalentnim vezama veže za orto-ugljikov atom iz aromatskog prstena, a posredovana je peroksinitritom (ONOO-) i dolazi do reakcije superoksidnih radikala sa NO. S druge strane S-nitrozilacijom se postiže vezanje nitro skupine na bočni ogranak cisteina. Specifično uklanjanje NO katalizirano je pomoću denitrase, koja čini ovu reakciju reverzibilnom.

Istraživanja su pokazala kako je NO uključen u otpornost biljaka na razne bolesti, odgovore na abiotički stres, homeostazu željeza i u druge fiziološke i razvojne procese u biljkama. (Slika 3.) (Lamotte i sur., 2005) Dokazan je i utjecaj na regulaciju otvaranja i zatvaranja puči zajedno sa biljnim hormonom apscizinskom kiselinom u stanicama zapornicama biljke *A. thaliana*. (Desikan i sur., 2002)

Nitracija tirozina je i jedan od čimbenika koji su uključeni u fotosintetski metabolizam ugljika zbog učinka smanjenja aktivnosti enzima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze i b-ugljične anhidraze. (Chaki i sur., 2009) Stres izazvan jakim intenzitetom svjetlosti može narušiti konformaciju proteina i drugih komponenata reakcijskog središta PSII, ali se njihova stabilnost i regeneracija može regulirati procesima nitracije tirozina i S-nitrozilacije (Galetskiy i sur., 2011)



Slika 3. Shematski prikaz procesa nitracije tirozina i S-nitrozilacije te čimbenici koji potiču te posttranslacijske modifikacije (Astier i Lindermayr, 2012)

2.5. Glikozilacija

Enzimima katalizirana reakcija pri kojoj se glikanske skupine nadodaju na proteinsku komponentu je reakcija glikozilacije. Glikoproteini imaju mnogobrojne strukturne i funkcionalne uloge u stanici. Glavnina proteina sintetiziranih na hrapavom endoplazmatskom retikulumu prolazi glikozilaciju kako bi se na taj način specificirali za pojedinu ulogu. Kovalentno vezanje glikana omogućuje pravilno namotavanje proteina i stvaranje njihove native strukture što im daje stabilnost i zaštitu od denaturacije. N-glikozilacija je jedan oblik glikozilacije, a zbiva se u lumenu endoplazmatskog retikuluma pri čemu se ugljikohidrati (oligosaharidni prekursor) prenose na amidnu skupinu asparagina koji je dio sekvence Asn-X-Ser/Thr, pri čemu je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Osim nje

postoji i O-glikozilacija, odnosno vezivanje glikana na hidroksilnu skupinu serina, treonina, hidroksilizina i hidroksiprolina. Glikozilacija pojedinog enzima utječe na njegovu katalitičku aktivnost, termostabilnost, namatanje, položaj u stanici, ali i imunitet biljke. (Lehtimäki i sur., 2015)

N-glikani koji se nalaze na vanjskoj domeni plazmatske membrane su receptori koji imaju određeni uzorak prepoznavanja i omogućuju kontakt između biljne stanice i raznih patogena koji napadaju stanicu. Uspostavljanjem komunikacije s njima javlja se imunološki odgovor. Biljne receptor kinaze su objekt N-glikozilacije, što implicira njihovu ulogu u uspostavljanju biljnog imuniteta. (Häweker i sur., 2010) Kod O-glikana je šećer vezan na serinski ili treoninski bočni ogranak u peptidnom lancu a imaju i utjecaj na stabilnost i konformaciju proteina, imunološke odgovore, stanični rast i proliferaciju, stanično signaliziranje te sintezu i formiranje stanične stijenke. (Velasquez i sur., 2012)

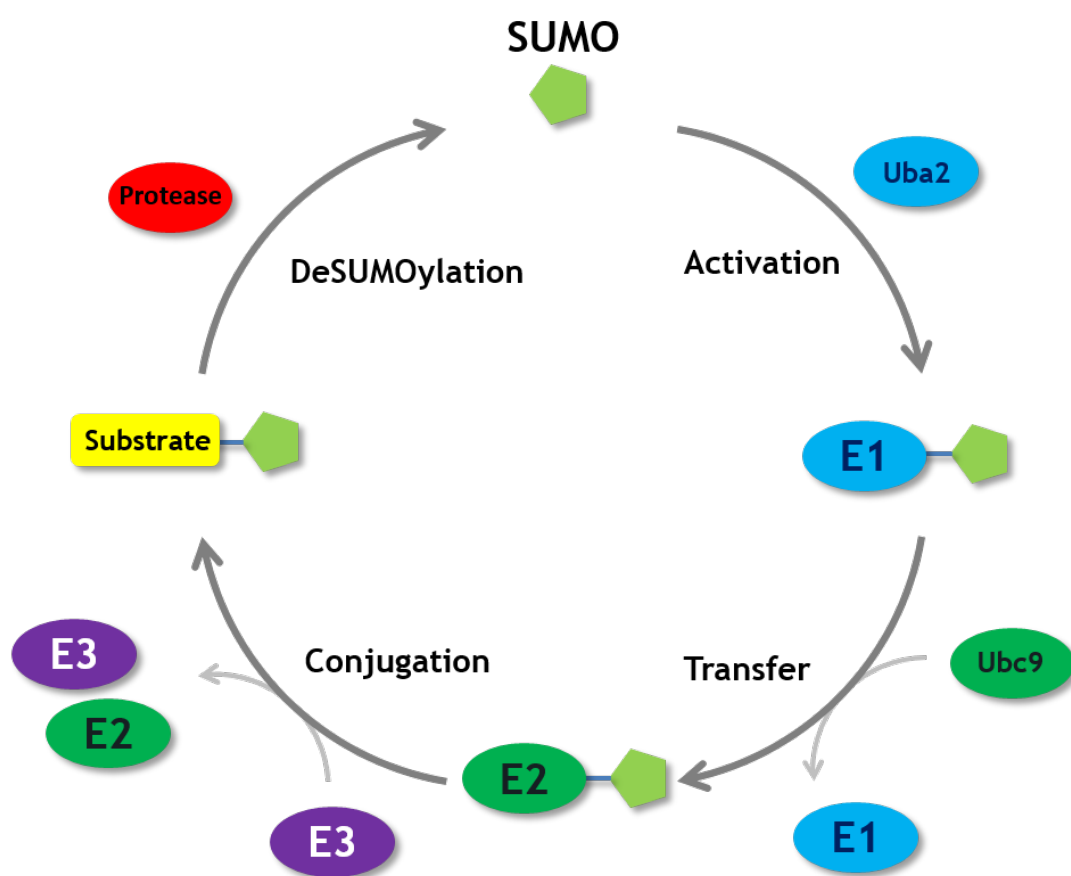
Također je dokazano da je proces glikozilacije povezan sa biljnim razvojem. Primjerice u mutantima *Arabidopsis*, kojima nedostaje α -glukozidaza koja otcjepljuje glukozne jedinice sa škroba, aktivnost i akumulacija N-glikana je blokirana već u ranoj fazi razvoja. U višim biljkama ova PTM također ima ulogu u procesima kao što su stanična diferencijacija, razvitak embrija i međustanična komunikacija. (Viëtor i sur., 2003)

2.6. Sumoilacija

Proteini kloroplasta prolaze i posttranslacijsku modifikaciju koja se naziva sumoilacija, a relativno je slabo istražena njezina uloga i funkcija u biljnim organizmima. Sumoilacija je proces koji obuhvaća kovalentno vezanje manje proteinske molekule nalik ubikvitinu (SUMO, *Small Ubiquitin-like Modifier*) na stanične proteine modificirajući njihovu funkciju. Proteini SUMO su vrlo mali, sastoje se od svega stotinjak aminokiselina i molekularna masa im je otprilike oko 12 kDa. Broj aminokiselina koje ga grade varira od organizma do organizma odnosno ovisi o njihovoj kompleksnosti.

Sumoilacija je uključena u mnoge stanične procese kao što su transport tvari iz jezgre u citosol, regulacija transkripcije, stanična apoptoza, stabilnost proteina, odgovor na uvjete stresa primjerice nedostatak fosfata, visoka i niska temperatura, suša ili napad patogena. Ovaj tip PTM uključuje nekoliko izoformi proteina koji provode reakcije sumoilacije i desumoilacije. (Park i sur., 2011)

Reakcija vezanja proteina SUMO događa se stvaranjem izopeptidne veze između C-terminalnog kraja glicina i ϵ -amino grupe lizina. (Rodriguez i sur., 2001) Za modificiranje proteina potrebna je aktivnost tri enzima: SUMO-aktivacijskog i SUMO-konjugacijskog enzima te SUMO ligaze, dok je za reverzibilnu reakciju uklanjanja zaslužna SUMO proteaza. (Slika 4.) Mnogi proteini kloroplasta kao što su feredoksin, podjedinice PSI i PSII se mogu modificirati sumoilacijom. Modifikacija se odvija u citoplazmi, a zatim se takvi sumoilizirani proteini unose u kloroplast kroz plastidnu ovojnicu. (Lehtimäki i sur., 2015)



Slika 4. Proces sumoilacije koji se odvija u tri koraka kataliziran enzimima i desumoilacija uz pomoć proteaze. Protein SUMO se aktivira uz pomoć heterodimernog enzima (enzim E1, Uba2 i Aos1) uz utrošak ATP-a. Konjugacijski enzim (enzim E2 i Ubc9) djeluje zajedno s nekoliko adapterskih proteina (E3 ligaze) kako bi prebacili protein SUMO na bočni ogranak lizina proteina koji je supstrat. Zatim se proces desumoilacije izvodi pomoću enzima proteaza i zatvara ciklus. (www.forney-lab.wikia.com)

3. ZAKLJUČAK

Napredak u razvoju metoda u molekularnoj biologiji koje su potrebne za proučavanje modifikacija nastalih nakon translacije stvorio je izvor novih i korisnih informacija koje se tiču toga područja znanosti. Te informacije i spoznaje pomogle su u razumijevanju mnogih fizioloških procesa i njihove regulacije u organizmima. Promatrajući stvari s molekularne razine, posttranslacijske modifikacije omogućile su povećanje varijabilnosti i specifičnosti među sintetiziranim proteinima. Na taj način procesima fosforilacije, acetilacije, metilacije, nitracije, nitrozilacije, glikozilacije, sumoilacije a i mnogim drugim modifikacijama, proteini su dobili ne samo svoju funkcionalnu strukturu nego i identitet. Nadograđivanjem proteina postignuti su učinci na mnoge stanične procese uz pomoću kojih funkcionira živi svijet.

U biljaka su posttranslacijski modificirani proteini značajni u reguliranju koraka reakcija fotosinteze. Od velike važnosti je i utjecaj na proteine kloroplasta čiji je transport u plastid nakon njihove biosinteze uz ove modifikacije olakšan. Reakcijska središta PSI i PSII i druge komponente koje sudjeluju u procesu prijenosa elektrona pod regulacijom su modificiranih proteina. Pod utjecajem pojedinih biotički i abiotičkih čimbenika također se mijenja stopa učestalosti posttranslacijskih modifikacija. Napadom patogena biljni organizam uz pomoć PTM stvara imunološki odgovor. Važna je i uloga PTM na međustaničnu komunikaciju i signaliziranje te na sam rast i razvoj organizma. Zahvaljujući enzimima koji su odgovorni za reverzibilnost nekih od ovih modifikacija na proteinima, omogućena je regulacija bioloških procesa aktiviranjem odnosno deaktiviranjem proteina koji sudjeluju u tim reakcijama.

Iako je zasada ovo područje znanosti relativno slabo opisano i razjašnjeno, vrlo je važno nastaviti s istraživanjima kako bi se uspostavile veze s dosad već otkrivenim stvarima kako bi se povukle određene paralele koje bi omogućile lakše razumijevanje novootkrivenih činjenica. Razumijevanje tih procesa važno je za napredak u razjašnjavanju procesa fotosinteze, funkcioniranja biljnog metabolizma, asimilacije i izmjene tvari te evoluciji i prilagodbi kopnenih biljaka na uvjete okoliša.

4. LITERATURA

- Alban, C., Tardif, M., Mininno, M., Brugière, S., Gilgen, A., Mazzoleni, M., Gigarel, O., Martin-Laffon, J., Ferro, M., Ravanel, S. (2014). Uncovering the protein lysine and arginine methylation network in Arabidopsis chloroplasts. *PloS One*, 9(4), e95512.
- Allen, J. F. (2002). Plastoquinone redox control of chloroplast thylakoid protein phosphorylation and distribution of excitation energy between photosystems: discovery, background, implications. *Photosynthesis Research*, 73(1-3), 139-148.
- Astier, J., Lindermayr, C. (2012). Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 15193-15208.
- Battey, N. H., Dickinson, H. G., & Hetherington, A. M. (1993). Post-translational modifications in plants (Vol. 53). Cambridge University Press.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A. M., Carreras, A., López-Jaramillo, J., Luque, F., Palma, J. M., Pedrajas, J. R., Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Gómez-Rodríguez, M. V., Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2009). Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus L.*) hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*, 60(15), 4221-4234.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., Neill, S. (2002). A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16314-16318.
- Ferrández-Ayela, A., Micol-Ponce, R., Sánchez-García, A. B., Alonso-Peral, M. M., Micol, J. L., Ponce, M. R. (2013). Mutation of an Arabidopsis NatB N-alpha-terminal acetylation complex component causes pleiotropic developmental defects. *PLoS One*, 8(11), e80697.
- Galetskiy, D., Lohscheider, J. N., Kononikhin, A. S., Popov, I. A., Nikolaev, E. N., Adamska, I. (2011). Phosphorylation and nitration levels of photosynthetic proteins are conversely regulated by light stress. *Plant molecular biology*, 77(4-5), 461-473.
- Häweker, H., Rips, S., Koiwa, H., Salomon, S., Saijo, Y., Chinchilla, D., Robatzek, S., von Schaewen, A. (2010). Pattern recognition receptors require N-glycosylation to mediate plant immunity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(7), 4629-4636.
- Lamotte, O., Courtois, C., Barnavon, L., Pugin, A., Wendehenne, D. (2005). Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta*, 221(1), 1-4.

Lehtimäki, N., Koskela, M. M., Mulo, P. (2015). Posttranslational modifications of chloroplast proteins: an emerging field. *Plant Physiology*, 168(3), 768-775.

Nallamilli, B. R. R., Edelmann, M. J., Zhong, X., Tan, F., Mujahid, H., Zhang, J., Nanduri, B., Peng, Z. (2014). Global analysis of lysine acetylation suggests the involvement of protein acetylation in diverse biological processes in rice (*Oryza sativa*). *PLoS One*, 9(2), e89283.

Park, H. J., Kim, W. Y., Park, H. C., Lee, S. Y., Bohnert, H. J., Yun, D. J. (2011). SUMO and SUMOylation in plants. *Molecules and cells*, 32(4), 305-316.

Pesaresi, P., Pribil, M., Wunder, T., Leister, D. (2011). Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: the roles of STN7, STN8 and TAP38. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8), 887-896.

Rao, R. S. P., Thelen, J. J., Miernyk, J. A. (2014). *In silico* analysis of protein Lys-Nε-acetylation in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5.

Rochaix, J. D., Lemeille, S., Shapiguzov, A., Samol, I., Fucile, G., Willig, A., Goldschmidt-Clermont, M. (2012). Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367(1608), 3466-3474.

Rodriguez, M. S., Dargemont, C., Hay, R. T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12654-12659.

Velasquez, M., Salter, J. S., Dorosz, J. G., Petersen, B. L., Estevez, J. M. (2012) Recent advances on the posttranslational modifications of EXTs and their roles in plant cell walls. *Frontiers in Plant Science* 3: 93

Viëtor, R., Loutelier-Bourhis, C., Fitchette, A. C., Margerie, P., Gonneau, M., Faye, L., Lerouge, P. (2003). Protein N-glycosylation is similar in the moss *Physcomitrella patens* and in higher plants. *Planta*, 218(2), 269-275.

Wu, X., Oh, M. H., Schwarz, E. M., Larue, C. T., Sivaguru, M., Imai, B. S., Yau, P. M., Ort, D. R., Huber, S. C. (2011). Lysine acetylation is a widespread protein modification for diverse proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155(4), 1769-1778.

5. SAŽETAK

Posttranslacijske modifikacije su modifikacije proteina na koje se tijekom sinteze ili nakon nje dodaju određene funkcionalne skupine kako bi se proteinima odredilo odredište i/ili uloga u stanici. Nakon translacije ove modifikacije proširuju raspon funkcija proteina, nakon vezanja drugih biokemijskih funkcionalnih skupina kao što su acetati, fosfati, ugljikohidrati i dr. a samim time se mijenja kemijska priroda aminokiselina. U proteinima kloroplasta ove modifikacije su značajne jer imaju važne uloge u procesu fotosinteze, u unošenju proteina u kloroplast kroz plastidnu ovojnica te u odgovorima na različite stresne uvjete.

Ovaj rad iznosi kratki pregled posttranslacijskih modifikacija koje se pojavljuju u biljnim organizmima. Neke od njih su: fosforilacija, acetilacija, metilacija, nitracija i nitrozilacija, glikolizacija te sumoilacija. Opisana su njihova svojstva, kemijski mehanizam vezanja, važnost kod staničnog signaliziranja i navedeni su neki fiziološki učinci proizašli djelovanjem ovih PTM.

6. SUMMARY

Posttranslational modifications are changes on proteins, which occur during protein synthesis or afterwards by adding certain functional groups, in order to determine their final destination and/or their role in the cell. After translation, these modifications extend the range of functions of the protein, upon binding of the other biochemical functional groups such as acetates, phosphates, carbohydrates, etc., and thus changing the chemical nature of the amino acids. PTMs of chloroplast proteins are significant because they play important roles in the process of photosynthesis, in protein transport to chloroplasts over the plastid envelope as well as in responses to the various stressful environmental conditions.

This work is a brief overview of types of posttranslational modifications that occur in the plant organism. Some of them are: phosphorylation, acetylation, methylation, nitration and nitrosylation, glycosylation and sumoylation. Here are described their properties, chemical binding mechanism, the importance at cell signalling and listed some of physiological effects which are result of these PTM actions.